

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-56415

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)3月12日

A 61 K 31/16
31/165
31/40
31/435
31/495
31/535
C 07 D 207/06
295/04
295/18

A A B

7252-4C
7252-4C

7252-4C

7019-4C
7451-4C
7451-4C

審査請求 未請求 請求項の数 12 (全10頁)

⑮ 発明の名称 虚血性脳細胞障害に対する細胞保護剤

⑯ 特 願 平1-191064

⑰ 出 願 平1(1989)7月24日

⑱ 発 明 者 望 月 大 介 静岡県田方郡菰山町寺家711-2

⑲ 出 願 人 東洋醸造株式会社 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1

⑳ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

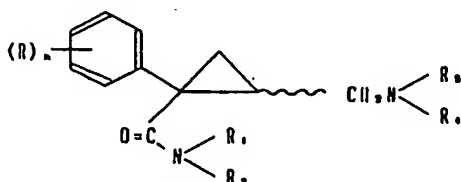
明 細 書

1. 発明の名称

虚血性脳細胞障害に対する細胞保護剤

2. 特許請求の範囲

1. 一般式



(式中、Rは水素原子、ハロゲン原子、低級アルキル、低級アルコキシ、ヒドロキシ、ニトロまたはアミノ基を示し、nは1または2を示し、R₁は水素原子、低級アルキル、ヒドロキシ低級アルキル、ハロゲン原子で置換されていてもよいフェニルまたはハロゲン原子で置換されていてもよいフェニル-低級アルキル基を示し、R₂は水素原子または低級アルキル基を示すか、あるいはR₁およびR₂が一緒になって分枝鎖を有していてもよい低級アルキレン基を形成するか、または隣接

する窒素原子と共に5～6員の複素環を形成してもよい。R₂は水素原子、低級アルキル、低級アルカノイルまたはアミノ-低級アルカノイル基を示し、R₁は水素原子または低級アルキル基を示すか、あるいはR₁およびR₂は隣接する窒素原子と共に他のヘテロ原子として窒素原子または酸素原子を有していてもよい5～6員の複素環を形成してもよい。)

で表わされる1-アリール-2-(アミノメチル)シクロプロパンカルボキシアミド誘導体またはその非毒性塩を有効成分とする虚血性脳細胞障害に対する細胞保護剤。

2. 1-アリール-2-(アミノメチル)シクロプロパンカルボキシアミド誘導体が1-フェニル-1-アミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-ジメチルアミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-エチルアミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-ジエチル

アミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-2-ジメチルアミノメチル-N-(4'-クロロフェニル)-シクロプロパン-カルボキシアミド、1-フェニル-2-ジメチルアミノメチル-N-(4'-クロロベンジル)-シクロプロパン-カルボキシアミド、1-フェニル-2-ジメチルアミノメチル-N-(2-フェニルエチル)-シクロプロパン-カルボキシアミド、1-(3,4-ジクロロフェニル)-2-ジメチルアミノメチル-N,N-ジメチル-シクロプロパン-カルボキシアミド、1-フェニル-1-ピロリジノカルボニル-2-モルホリノメチル-シクロプロパン、1-p-クロロフェニル-1-アミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-o-クロロフェニル-1-アミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-p-ヒドロキシフェニル-1-アミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-p-ニトロフェニル-1-ジメチルアミノカルボニル-2-ジメチルアミノ

メチル-シクロプロパン、1-p-アミノフェニル-1-ジメチルアミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-p-トリル-1-メチルアミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-p-メトキシフェニル-1-メチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-アミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-エチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-ジメチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-o-クロロフェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-m-クロロフェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-p-クロロフェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-p-フルオロフェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-p-

トリル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-2-アミノメチル-N-エチル-N-2-ヒドロキシエチル-シクロプロパン-カルボキシアミド、1-フェニル-1-ジブチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-2-アミノメチル-N,N-ジ-イソプロピル-シクロプロパン-カルボキシアミド、1-フェニル-1-ジブチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-ピロリジノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-(2,5-ジメチルピロリジノ)カルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-(2,6-ジメチルピペリジノ)カルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-メチルアミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-ジエチルアミノカ

ルボニル-2-アセチルメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-グリシルアミノメチル-シクロプロパンまたは1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-(4-メチルピペラジノ)メチル-シクロプロパンである請求項1記載の虚血性脳細胞障害に対する細胞保護剤。

3. 有効成分が1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン(2)塩酸塩である請求項1記載の虚血性脳細胞障害に対する細胞保護剤。

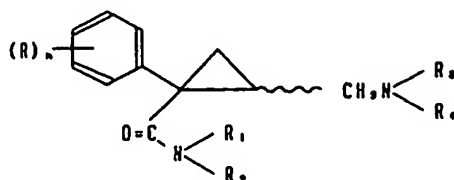
4. 有効成分が1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン(E)塩酸塩である請求項1記載の虚血性脳細胞障害に対する細胞保護剤。

5. 有効成分が1-フェニル-1-エチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン(2)シュウ酸塩である請求項1記載の虚血性脳細胞障害に対する細胞保護剤。

6. 有効成分が1-p-トリル-1-ジエチル

アミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン(2)塩酸塩である請求項1記載の虚血性脳細胞障害に対する細胞保護剤。

7. 一般式



(式中、Rは水素原子、ハロゲン原子、低級アルキル、低級アルコキシ、ヒドロキシ、ニトロまたはアミノ基を示し、nは1または2を示し、R₁は水素原子、低級アルキル、ヒドロキシ低級アルキル、ハロゲン原子で置換されていてもよいフェニルまたはハロゲン原子で置換されていてもよいフェニル-低級アルキル基を示し、R₂は水素原子または低級アルキル基を示すか、あるいはR₁およびR₂が一緒になって分枝鎖を有していてもよい低級アルキレン基を形成するか、または隣接する窒素原子と共に5～8員の複素環を形成して

もよい。R₂は水素原子、低級アルキル、低級アルカノイルまたはアミノ-低級アルカノイル基を示し、R₁は水素原子または低級アルキル基を示すか、あるいはR₂およびR₁は隣接する窒素原子と共に他のヘテロ原子として窒素原子または酸素原子を有していてもよい5～8員の複素環を形成してもよい。)

で表わされる1-アリール-2-(アミノメチル)シクロプロパンカルボキシアミド誘導体またはその非毒性塩を有効成分とするN-メチル-D-アスパラギン酸型レセプターの拮抗剤。

8. 1-アリール-2-(アミノメチル)シクロプロパンカルボキシアミド誘導体が1-フェニル-1-アミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-ジメチルアミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-エチルアミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロ

パン、1-フェニル-2-ジメチルアミノメチル-N-(4'-クロロフェニル)-シクロプロパン-カルボキシアミド、1-フェニル-2-ジメチルアミノメチル-N-(4'-クロロベンジル)-シクロプロパン-カルボキシアミド、1-フェニル-2-ジメチルアミノメチル-N-(2-フェニルエチル)-シクロプロパン-カルボキシアミド、1-(3,4-ジクロロフェニル)-2-ジメチルアミノメチル-N,N-ジメチル-シクロプロパン-カルボキシアミド、1-フェニル-1-ピロリジノカルボニル-2-モルホリノメチル-シクロプロパン、1-p-クロロフェニル-1-アミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-o-クロロフェニル-1-アミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-p-ヒドロキシフェニル-1-アミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-p-ニトロフェニル-1-ジメチルアミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-p-アミノフェニ

ル-1-ジメチルアミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-p-トリル-1-メチルアミノカルボニル-2-ジメチルアミノメチル-シクロプロパン、1-p-メトキシフェニル-1-メチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-アミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-ジメチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-o-クロロフェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-m-クロロフェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-p-クロロフェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-p-フルオロフェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-p-トリル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-ア

ミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-2-アミノメチル-N-エチル-N-2-ヒドロキシエチル-シクロプロパン-カルボキシアミド、1-フェニル-1-ジプロピルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-2-アミノメチル-N,N-ジ-イソプロピル-シクロプロパン-カルボキシアミド、1-フェニル-1-ジブチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-ジヘキシルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-ピロリジノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-(2,5-ジメチルピロリジノ)カルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-(2,6-ジメチルピベリジノ)カルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-メチルアミノメチル-シクロプロパン、1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アセチルメチル-シクロプロパン、

1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-グリシルアミノメチル-シクロプロパンまたは1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-(4-メチルピベラジノ)メチル-シクロプロパンである請求項7記載のN-メチル-D-アスパラギン酸型レセプターの拮抗剤。

9. 有効成分が1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン(2)塩酸塩である請求項7記載のN-メチル-D-アスパラギン酸型レセプターの拮抗剤。

10. 有効成分が1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン(E)塩酸塩である請求項7記載のN-メチル-D-アスパラギン酸型レセプターの拮抗剤。

11. 有効成分が1-フェニル-1-エチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン(2)シュウ酸塩である請求項7記載のN-メチル-D-アスパラギン酸型レセプターの拮抗剤。

12. 有効成分が1-p-トリル-1-ジエチ

ルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン(2)塩酸塩である請求項7記載のN-メチル-D-アスパラギン酸型レセプターの拮抗剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、虚血性脳細胞障害に対する細胞保護剤に関し、更に詳しくは種々の原因により脳細胞が虚血状態になることにより生じる脳細胞の障害に対する細胞保護剤に関する。

(従来の技術)

脳内に高濃度に存在する酸性アミノ酸であるグルタミン酸あるいはアスパラギン酸が強力な中枢神経興奮作用を有し、脳虚血時、虚血部位におけるこれらの酸性アミノ酸の局所濃度が著しく増加することが知られている(J. Neurochemistry, Vol. 43, No. 5, 1369-1374 (1984))。この酸性アミノ酸が中枢神経系の多くのシナプスで興奮性伝達物質としての役割を果たすだけでなく、脳の可塑性の発現、急性、慢性に起こるニューロンの

壊死に重要な関連のあることが明らかにされている。この酸性アミノ酸により興奮する中枢神経細胞のレセプターとしては、キスカル酸型レセプター、カイニン酸型レセプターおよびN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)型レセプターの少なくとも3種が区別されており、これらの酸性アミノ酸はNMDA型レセプターを異常に活性化させ、不可逆な脳細胞傷害を引き起すとされている(Science, Vol. 226, 850-852 (16 Nov. 1984))。このNMDA型レセプターはカチオンチャンネルを有する複合な複合体を形成しており、NMDA型レセプターの活性化を増強するストリキニーネ非感受性グリシンレセプターが隣接して存在しているために、NMDA型レセプターのアゴニスト(作動薬)であるグルタミン酸とグリシンレセプターの作動薬であるグリシンが共にこれらのレセプターに結合するとNMDA型レセプターは著しく活性化され、カチオンチャンネルを大きく開口させることが知られている。このNMDA型レセプターによって開くチャンネルが

Ca^{2+} を通しやすいために、神経細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇が細胞の壊死の原因とされている。

NMDA型レセプターによって開くチャンネルの中にフェンサイクリジン(PCP)レセプターが存在し、このPCPレセプターの作動薬、例えば1-[1-(2-チエニル)シクロヘキシル]ピペリジン(TCP)はNMDA型レセプターの活性化を非競合的に抑制することが知らされている(TIPS, Vol. 8, 243-244 (July 1987))。このTCPはNMDA型レセプター拮抗作用により、動物モデルに対して脳虚血を保護することが知られている(J. Cerebral Blood Flow and Metabolism, Vol. 7, Suppl. 1, S144 (1987))。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかしながら、未だに臨床において、脳虚血のために起きる脳細胞障害を有効に抑制し得る薬剤の開発はなされていないのが現状である。

〔課題を解決するための手段〕

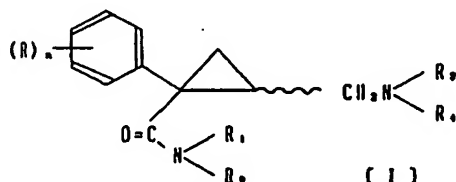
興奮性アミノ酸のレセプターの1つであるNMDA型レセプターはカチオンチャンネルを有

する複雑な複合体を形成しており、NMDA型レセプターの作動薬であるグルタミン酸がこのレセプターに結合した場合、NMDA型レセプターは著しく活性化され、NMDA型レセプターのカチオンチャンネルは大きく開口される。このカチオンチャンネルを閉じるように作用する物質はNMDA型レセプターのアンタゴニスト(拮抗剤)となり、これは、更に虚血性の脳細胞障害に対する細胞保護剤として使用し得るものである。

かかる知見に基づいて、本発明者らは、NMDA型レセプターによって活性化されるカチオンチャンネル内に存在してカチオンチャンネルを閉じるように働くPCPレセプターの作動薬である ^3H -TCPをリガンドとして結合実験を行えば、カチオンチャンネルを閉じるように作用する物質は ^3H -TCP結合を阻害するという形で検出されることに着目し、鋭意研究した結果、従来より中枢神経系障害の治療に用いた場合、極めて明らかな抗うつ作用を有することが知られている後記一般式で表わされる1-アリール-2-(アミノメチル)シ

クロプロパンカルボキシアミド誘導体がNMDA型レセプターの活性化を抑制し、脳細胞障害に対する細胞保護剤として有効であることを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、一般式(1)



(式中、Rは水素原子、ハロゲン原子、低級アルキル、低級アルコキシ、ヒドロキシ、ニトロまたはアミノ基を示し、nは1または2を示し、R₁は水素原子、低級アルキル、ヒドロキシ低級アルキル、ハロゲン原子で置換されていてもよいフェニルまたはハロゲン原子で置換されていてもよいフェニル-低級アルキル基を示し、R₂は水素原子または低級アルキル基を示すか、あるいはR₁およびR₂が一緒になって分枝鎖を有していてもよい低級アルキレン基を形成するか、または隣接

する窒素原子と共に5~6員の複素環を形成してもよい。R₃は水素原子、低級アルキル、低級アルカノイルまたはアミノ-低級アルカノイル基を示し、R₄は水素原子または低級アルキル基を示すか、あるいはR₃およびR₄は隣接する窒素原子と共に他のヘテロ原子として窒素原子または酸素原子を有していてもよい5~6員の複素環を形成してもよい。)

で表わされる1-アリール-2-(アミノメチル)シクロプロパンカルボキシアミド誘導体またはその非毒性塩を有効成分とする虚血性脳細胞障害に対する細胞保護剤を提供するものである。

また、本発明は、一般式(1)で表わされる1-アリール-2-(アミノメチル)シクロプロパンカルボキシアミド誘導体またはその非毒性塩を有効成分とするNMDA型レセプターの拮抗剤を提供するものである。

本発明の有効成分である式(1)で表わされる1-アリール-2-(アミノメチル)シクロプロパンカルボキシアミド誘導体およびその非毒性塩

ある。この投与量は、患者の体重、症状に応じ、適宜増減することができる。

尚、本発明の有効成分の毒性は、マウス（1群10匹、雄、20～26g、スイス系）に経口投与した結果、次の第2表に示すLD₅₀値で示される。

以下余白

第 2 表

配置	(R) ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	塩	LD ₅₀ mg/kg
Z	H	H	H	-CH ₃	-CH ₃	—	> 300
Z	H	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	塩酸塩	> 300
Z	H	-C ₂ H ₅	H	-CH ₃	-CH ₃	マレイン酸塩	> 300
Z	H	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	H	H	塩酸塩	240
Z	H	-C ₆ H ₅ -C ₂ H ₅ (p)	H	-CH ₃	-CH ₃	塩酸塩	> 300
Z	H	-CH ₃ C ₆ H ₄ -C ₂ H ₅ (p)	H	-CH ₃	-CH ₃	マレイン酸塩	> 300
Z	H	-CH ₃ CH ₂ C ₆ H ₅	H	-CH ₃	-CH ₃	塩酸塩	> 300
Z	-C ₂ H ₅ (3, 4)	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	塩酸塩	> 300
Z	H		-(CH ₂) ₄ -	-CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ -		塩酸塩	> 300
Z	-C ₂ H ₅ (p)	H	H	H	H	塩酸塩	> 300
Z	-C ₂ H ₅ (o)	H	H	-CH ₃	-CH ₃	塩酸塩	> 300
Z	-OH (p)	H	H	-CH ₃	-CH ₃	塩酸塩	> 300
Z	-NO ₂ (p)	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	塩酸塩	> 300
Z	-NH ₂ (p)	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	塩酸塩	> 300
Z	-CH ₃ (p)	-CH ₃	H	-CH ₃	-CH ₃	塩酸塩	> 300
Z	-OCH ₃ (p)	-CH ₃	H	H	H	塩酸塩	> 300
Z	H	H	H	H	H	塩酸塩	> 300
Z	H	-C ₂ H ₅	H	H	H	シュウ酸塩	320

第 2 表 (つづき)

配置	(R) ₁	R ₂	R ₃	R ₄	塩	LD ₅₀ mg/kg
Z	H	-CH ₃	-CH ₃	H	H	塩酸塩 320
Z	-C ₂ H ₅ (o)	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	H	H	塩酸塩 420
Z	-C ₂ H ₅ (m)	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	H	H	塩酸塩 100
Z	-C ₂ H ₅ (p)	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	H	H	塩酸塩 420
Z	-F (p)	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	H	H	塩酸塩 420
Z	-CH ₃ (p)	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	H	H	塩酸塩 750
Z	H	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	H	H	シュウ酸塩 100
Z	H	-i-C ₃ H ₇	-i-C ₃ H ₇	H	H	塩酸塩 100
Z	H	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	H	H	シュウ酸塩 560
Z	H	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	H	H	シュウ酸塩 > 1000
Z	H	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	H	H	シュウ酸塩 560
Z	H	-CH(CH ₃)-(CH ₂) ₄ -CH(CH ₃)-	-CH(CH ₃)-(CH ₂) ₄ -CH(CH ₃)-	H	H	フマル酸塩 100
Z	H	-CH(CH ₃)-(CH ₂) ₄ -CH(CH ₃)-	-CH(CH ₃)-(CH ₂) ₄ -CH(CH ₃)-	H	H	フマル酸塩 130
Z	H	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	-CH ₃	H	シュウ酸塩 320
Z	H	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	-COCH ₃	H	> 1000
Z	H	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	-COCH ₃ NH ₂	H	240
Z	H	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	-(CH ₂) ₃ N(CH ₃)-(CH ₂) ₃ -	H	> 1000
E	H	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	H	H	塩酸塩 560

〔実施例〕

次に、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例 1

注射剤

1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン (Z) 塩酸塩 1.0 g を注射用蒸留水 1 ml に溶解し、1 N-水酸化ナトリウム水溶液で pH 6 ~ 7 に調節した後、滅菌し、これをアンプルに 5 ml ずつ充填して注射剤を得た。

実施例 2

錠 剤

1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン (Z) 塩酸塩 50 mg
 とうもろこし澱粉 40 mg
 結晶セルロース 80 mg
 ステアリン酸マグネシウム 0.5 mg
 タルク 29.5 mg

の組成からなる 1 錠 200 mg の錠剤を乾式打錠により得た。

実施例 3

ラット大脳皮質膜成分における本発明の有効成分の ³H-TCP 結合阻害能

1) ラット大脳皮質膜成分の調製

SD 系雄性ラット (200 ~ 300 g、5 匹) を断頭後、すばやく脳を取り出し、これを氷冷した 0.32 M ショ糖溶液に浸しながら大脳皮質を摘出し、重量を測定したところ 4.0 g であった。これに 10 mM N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸水溶液 (HEPBS) (pH 7.4) 20 ml (30 倍量) を加え、ホモジナイザー (500 rpm) でホモジネートした。このホモジネートを遠心分離 (48000 g、15 分 (以下の遠心分離の条件は特記しない限り、これに同じ)) し、得られた沈渣を蒸留脱イオン水 20 ml で再浮遊し、37℃で 20 分間保温した。これを遠心分離し、得られた沈渣を再び蒸留脱イオン水 20 ml で再浮遊し、37℃で 20 分間保温した後、

遠心分離により沈渣を集めた。この沈渣を1 mM エチレンジアミン四酢酸 (BDTA) 含有10 mM HEPBS (pH7.4) 20 mlで再浮遊し、37℃で20分間保温した後、遠心分離により沈渣を集め、同様に1 mM BDTA含有10 mM HEPBS (pH7.4) 20 mlで再浮遊し、37℃で20分間保温した。これを再び遠心分離により沈渣を集め、10 mM HEPBS (pH7.4) 26 mlに再浮遊した後、2 mlずつ分注し、大脳皮質膜面分として-80℃で保存した。

2) ^3H -TCP 結合能の測定方法

上記で調製したラット大脳皮質膜面分凍結保存液2 mlを測定実験の直前に解凍し、10 mM HEPBS (pH 7.4) 30 ml (100倍量)を加えて希釈した。この希釈液を遠心分離し、得られた沈渣を10 mM HEPBS (pH7.4) 30 mlに再浮遊し、再び遠心分離により沈渣を集めた。この沈渣を同様の方法でさらに2回洗浄し、得られた沈渣を10 mM HEPBS (pH7.4) 6 mlに再浮遊し、 ^3H -TCP 結合能測定用膜面分として使用した。

第 3 表

被検体	使用量	^3H -TCP 結合阻害率
被検体 1	10^{-4}M	93.8%
	10^{-5}M	70.8%
被検体 2	10^{-4}M	75.5%
被検体 3	10^{-4}M	66.7%
被検体 4	10^{-4}M	55.8%

被検体 1: 1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン (Z) 塩酸塩

被検体 2: 1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン (E) 塩酸塩

被検体 3: 1-フェニル-1-エチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン (Z) 塩酸塩

被検体 4: 1-ポートリル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン (Z) シュウ酸塩

この膜面分0.1 mlに被検体、 ^3H -TCP (ニューイングランド・ヌクレア社製、比活性60 Ci (2220 GBq)/mM、最終濃度2.5 nM)、グルタミン酸 (最終濃度 10^{-3}M) およびグリシン (最終濃度 10^{-3}M)を加え、全量1 mlとして25℃で60分間保温した。この溶液をガラス繊維濾紙 (Whatman GF/C, 0.05%ポリエチレンイミン (PEI) で4℃、3時間以上の処理)を用いて吸引濾過し、濾紙を10 mM HEPBS (pH7.4) 5 mlで2回洗浄した。この濾紙をバイアル瓶に移して乾燥させた後、トルエン系液体シンチレータを5 ml加えて放射活性を測定した。特異的結合能はPCP $100\text{ }\mu\text{M}$ 存在下で行った値を非存在下で行った値から差し引いて算定した。

3) 測定結果

ラット大脳皮質膜面分における本発明の有効成分の ^3H -TCP 結合阻害能を測定した結果は、次の第3表の通りである。

実施例 4

ラット海馬膜面分における本有効成分の ^3H -TCP 結合阻害能

1) ラット海馬膜面分の調製

SD系雄性ラット (200~300 g、5匹)を断頭後、すばやく脳を取り出し、これを氷冷した0.32 Mショ糖溶液に浸しながら大脳皮質を摘出し、重量を測定したところ0.7 gであった。これに10 mM HEPBS (pH7.4) 20 ml (30倍量)を加え、ホモジナイザー (500 rpm)でホモジネートした。このホモジネートを遠心分離し、得られた沈渣を蒸留脱イオン水20 mlで再浮遊し、37℃で20分間保温した後、遠心分離し、得られた沈渣を再び蒸留脱イオン水20 mlで再浮遊し、37℃で20分間保温した後、遠心分離により沈渣を集めた。この沈渣を1 mM BDTA含有10 mM HEPBS (pH7.4) 20 mlで再浮遊し、37℃で20分間保温した後、遠心分離により沈渣を集め、同様に1 mM BDTA含有10 mM HEPBS (pH7.4) 20 mlで再浮遊し、37℃で20分間

保温した。これを再び遠心分離により沈渣を集め、10 mM HEPES (pH7.4) 6 mlに再浮遊した後、2 mlずつ分注し、海馬膜面分として-80℃で保存した。

2) ^3H -TCP 結合能の測定方法

上記で調製したラット海馬膜面分凍結保存液2 mlを測定実験の直前に解冻し、10 mM HEPES (pH7.4) 23 ml (100倍量)を加えて希釈した。この希釈液を遠心分離し、得られた沈渣を10 mM HEPES (pH7.4) 30 mlに再浮遊し、再び遠心分離により沈渣を集めた。この沈渣を同様の方法でさらに2回洗浄し、得られた沈渣を10 mM HEPES (pH7.4) 4.5 mlに再浮遊し、 ^3H -TCP結合能測定用膜面分として使用した。

この膜面分を用いる本発明の有効成分の ^3H -TCP結合阻害能の測定は、実施例3に記載の方法と同様に行って算定した。

3) 測定結果

ラット海馬膜面分における本発明の有効成分の ^3H -TCP結合阻害能を測定した結果は、次の第4表

の通りである。

第4表

被験体	使用量	^3H -TCP結合阻害率
被験体1	10^{-4}M	82.3%
	10^{-5}M	64.6%
被験体2	10^{-4}M	83.8%
	10^{-5}M	51.4%
被験体3	10^{-4}M	85.3%
被験体4	10^{-4}M	48.3%

被験体1～4は実施例3に記載の被験体1～4と同一物質である。

上記の実施例3および4における測定結果から明らかな如く、本発明の有効成分はNMDA型レセプター複合体数が多く、虚血に弱いラット大脳皮質膜面分および海馬膜面分における ^3H -TCP結合阻害能を有していることから、虚血性脳細胞障害に対して細胞保護作用を有する。

実施例5

マウスにおけるNMDA誘発致死作用に対する

1-フェニル-1-ジエチルアミノカルボニル-2-アミノメチル-シクロプロパン(2)塩酸塩(被験薬1)の保護効果

1) 測定方法

ddY系雄性マウス(1群10匹、20～28g、5週齢)に被験薬1を各々20、40および80 mg/kg(液量0.1 ml/10g体重)並びにコントロール群として生理食塩水(液量0.1 ml/10g体重)を腹腔内投与し、30分後にNMDA 10 mg/kg(液量0.05 ml/10g体重)を尾静脈より数秒かけて投与した。コントロール群はNMDA投与後177±33秒で全匹が死亡するが、被験薬投与群では生き残った匹数の割合をNMDA誘発致死作用に対する保護率として算定した。

2) 測定結果

上記の測定方法によりマウスにおけるNMDA誘発致死作用に対する被験薬1の保護効果を測定した結果は、次の第5表の通りである。

第5表

投与薬	投与量 (mg/kg)	保護率 (%)
生理食塩水	—	0
被験薬1	20	30
"	40	50
"	80	70

以上の結果より、被験薬1はNMDA型レセプターの活性化を抑制し、脳細胞障害に対する細胞保護作用を有する。

〔発明の効果〕

本発明の薬剤は有効成分である1-アリール-2-(アミノメチル)シクロプロパンカルボキシアミド誘導体(1)またはその非毒性塩が興奮性アミノ酸レセプターの1つであるNMDA型レセプターの拮抗物質として作用し、虚血性脳細胞障害に対して細胞保護作用を有するため、脳梗塞、脳出血、脳動脈硬化症、頭部外傷、心停止、重篤なショック症状などの脳虚血性疾患による脳細胞障害の改善および予防に有用なものである。